

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



"Polimorfismos dos recetores β 2 adrenérgicos e de mecanismos antioxidantes na asma"

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Ana Marta Lourenço Luís

Dissertação orientada por:

Prof. Deodália Dias
Prof. Manuel Bicho

2016

Agradecimentos

E com muito orgulho que concluo esta etapa muito importante da minha vida, a qual só foi possível concretizar devido ao apoio de diversas pessoas a quem expresso a minha gratidão.

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Manuel Bicho pela oportunidade de poder concretizar este trabalho e pela orientação e apoio concedidos.

Ao serviço de ImunoAlergologia do Hospital de Santa Maria, na pessoa da Doutora Margarida Cortez por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho e por todo o apoio dado durante a parte pratica deste trabalho e sobretudo na escrita desta tese.

Agradeço à professora Deodália Dias por todo o apoio e orientação dados durante esta etapa.

A todas as pessoas que me acompanharam na realização da parte pratica deste trabalho: Ângela Dias, Carolina Santos e sobretudo à Andreia Matos por todo o apoio dado não só durante a parte pratica como durante a escrita desta tese.

À minha família, que sempre me apoiaram não só nesta etapa mas durante toda a minha vida, por todo o apoio, esforço e incentivo.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Simone, Sara, Laura, Manuela, Mariana e sobretudo à Joana por todo o incentivo e apoio que me deram sempre e claro pela amizade.

Aos amigos de sempre, Tiago, Diana, Daniela e sobretudo a Patrícia e a Angelina por todo o apoio, incentivo e no fundo por toda a amizade.

Um sincero muito Obrigada a todos.

Índice geral

<u>Agradecimentos</u>	<u>1</u>
<u>Índice de figuras</u>	<u>4</u>
<u>Índice de tabelas</u>	<u>5</u>
<u>Lista de abreviaturas</u>	<u>6</u>
<u>Sumário</u>	<u>8</u>
<u>Abstract</u>	<u>9</u>
<u>Estado da arte</u>	<u>10</u>
Asma	<u>10</u>
- Fisopatologia da asma	11-
- Desenvolvimento da asma no doente	14
- Processo inflamatório na asma	15
- Tratamento e controlo	18
GST (glutathiono-s-transferase)	<u>19</u>
- Considerações gerais	19
- Polimorfismos do <i>GST</i>	20
- Estudos anteriores sobre o GST e a asma	22
<i>ADR</i>β_2 (recetores β_2 adrenérgicos)	<u>25</u>
- Considerações gerais	25
- Polimorfismos do <i>ADR</i> β_2	26
- Estudos anteriores sobre o <i>ADR</i> β_2 e a asma	26
<u>Objetivos</u>	<u>30</u>
<u>Materiais e Métodos</u>	<u>31</u>
- População estudada	31
- Extração do ADN	31
- Quantificação do ADN	32
- <i>GST</i> (glutathiono-S-transferase)	32
- <i>ADR</i> β_2 (recetor β_2 adrenérgico)	33

- Analise estatística	33
<u>Resultados</u>	<u>34</u>
- Características da população estudada	34
- <i>ADRβ2</i>	35
- Asmáticos e controlos	35
- Asmáticos alérgicos e não alérgicos , controlados e não controlados	37
- <i>GSTM1</i>	38
- Asmáticos e controlos	38
- Asmáticos alérgicos e não alérgicos , controlados e não controlados	39
- <i>GSTT1</i>	39
- Asmáticos e controlos	40
- Asmáticos alérgicos e não alérgicos , controlados e não controlados	40
<u>Discussão</u>	<u>43</u>
<u>Conclusão</u>	<u>48</u>
<u>Bibliografia</u>	<u>49</u>

Índice de figuras

Figura 1: resposta inflamatória na asma	16
Figura 2: localização do gene <i>GSTM1</i>	21
Figura 3: localização do gene <i>GSTT1</i>	21
Figura 4: localização do gene <i>ADRβ2</i>	26

Índice de tabelas

Tabela 1 : Sintomas da asma	10
Tabela 2 : características da amostras estudada	34
Tabela 3 : Distribuição dos genótipos <i>ADRB2</i> entre asmáticos e controles	35
Tabela 4: Distribuição dos genótipos do <i>ADRB2</i> entre asmáticos alérgicos e não alérgico, controlados e não	37
Tabela 5 : Distribuição dos genótipos do <i>GSTM1</i> entre asmáticos e controles	38
Tabela 6: Distribuição dos genótipos do <i>GSTM1</i> entre alérgicos e não alérgicos, controlados e não	39
Tabela 7: Distribuição dos genótipos do <i>GSTT1</i> entre asmáticos e controles	40
Tabela 8: Distribuição dos genótipos do <i>GSTT1</i> entre alérgicos e não alérgicos , controlados e não	40
Tabela 9: Relação epistática entre os dois polimorfismos dos genes GST	41
Tabela 10 : Relação entre os dois polimorfismos dos genes <i>GSTT1</i> e <i>ADRB2</i>	42
Tabela 11: Relação entre os dois polimorfismos dos genes <i>GSTM1</i> e <i>ADRB2</i>	42

Índice de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADR β_2 : recetores beta 2 adrenergicos

AMP_c: monofosfato cíclico de adenosina

ARN: ácido ribonucleico

β_2 : beta 2

°C : graus centígrados

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs : nucleótidos do DNA

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FEV1: volume expiratório forçado no 1º segundo

GINA : Global Initiative for Asthma

Gs : subunidade da proteína G

G $\beta\gamma$: subunidade da proteína G

GSH : glutationo

GSSG : forma oxidada do glutationo

GST : Glutationo-s-transferase

GSTM1: Glutationo-s-transferase *Mu 1*

GSTT1: Glutationo-s-transferase theta 1

Ig : imunoglobulina

IgA : imunoglobulina A

IgD : imunoglobulina D

IgE : imunoglobulina E

IgM : imunoglobulina M

IL-3 : interleucina 3

IL-4 : interleucina 4

IL-5 : interleucina 5

IL-9 : interleucina 9

IL-13: interleucina 13

MgCl₂ : cloreto de magnésio

mM : mini Mol

m/v: massa / volume

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

ng : nanograma

nm: nanometros

OR : Odds Ratio

PEF : Débito Expiratório Máximo Instantâneo

PCR : reação de proteínas em cadeia

pH : potencial de hidrogénio (indicador de acidez)

pmol : picomol

RFLP : polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

SNP : polimorfismo de nucleótido simples

Th: linfócito auxiliar

Th2: linfócito auxiliar 2

U : unidade

µl: microlitro

Sumário

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas. Quando expostas a certos estímulos, as vias aéreas ficam inflamadas com obstrução do fluxo do ar, aumento da produção de muco e hiper-reatividade brônquica, provocando dificuldades respiratórias e ocorrência de sibilos. Nesta dissertação é proposto o estudo dos vários determinantes que se pensam que possam estar relacionados com a fisiopatologia da asma.

As enzimas que destoxificam as espécies reativas de oxigénio contribuem para as variações que existem durante exposição a um alérgénio. A família de genes Glutathione-S-Transferase (*GST*) é importante para proteção das células contra as espécies reativas de oxigénio e por isso estes genes foram propostos como genes relacionados com a asma. Nesta dissertação é proposto estudar os polimorfismos M1 e T1 do gene *GST*.

Os recetores β_2 adrenérgicos (*ADRB2*) estão envolvidos no relaxamento dos músculos lisos. Os seus agonistas levam à broncodilatação. Os polimorfismos destes recetores alteram a expressão, a ligação do ligando, o acoplamento ou fenótipos de regulação.

Neste trabalho vão ser estudados cerca de cento e trinta e cinco doentes asmáticos e duzentos e oitenta e oito dadores como grupo controlo, aos quais é extraído ADN, que será submetido a reação de PCR e a PCR – RFLP, para se analisar os vários polimorfismos que possam estar relacionados com a asma.

Neste nosso estudo conseguimos observar uma diferença significativa entre asmáticos e controlos ($p=0.024$) e entre asmáticos alérgicos e não alérgicos ($p=0.0035$) para o polimorfismo do *GSTT1*. O alelo nulo do *GSTT1* é mais frequente nos doentes asmáticos (em relação aos dadores) e nos doentes com asma alérgica (em relação aos asmáticos que não tem uma base alérgica). Este polimorfismo pode ter um papel no desenvolvimento da asma mas estes dados devem ser confirmados com outros estudos. Para os polimorfismos do *ADRB2* e do *GSTM1* não foram observadas, neste estudo, diferenças significativas entre os grupos estudados.

Palavras-chave: Asma, recetor β_2 adrenérgico, glutathione-S-transferase, polimorfismos

Abstract

Asthma is a complex genetic disease caused by the interaction of environmental and genetic factors which will create a greater susceptibility in the inflammation of the airways when exposed to certain triggers. In this thesis is proposed the study of the polymorphisms of three genes that might be related to asthma physiopathology.

GST genes have a function of protecting the cells against oxygen-reactive species, so the polymorphisms of this gene might influence the development of the disease. This study focused the M1 and T1 polymorphisms of this gene.

ADRβ₂ have a role in the relaxation of smooth muscles. The agonists of *ADRβ₂* promote the bronchodilation so this gene might influence asthma and the therapeutic response. In this thesis is focused the Arg16Gly polymorphism of this gene.

135 asthmatics and 288 controls were study through PCR and RFLP analyses.

It was found a significant difference between asthmatics and controls (0.024) and between allergic and non allergic asthmatics (0.035) in the *GSTT1* polymorphism. The null allele of *GSTT1* is more common in the asthmatics (comparing to donors) and in allergic asthmatics (comparing to those asthmatics who don't have an allergic base). Regarding *ADRβ₂* and *GSM1* no differences were found between asthmatics and donors or between allergic asthmatics and non-allergic asthmatics

Key-words: Asthma, β_2 adrenergic receptor, glutathione-S-transferase, polymorphisms

Estado da Arte

Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que afeta os pulmões e causa falta de ar, sibilos, aperto no peito e tosse, normalmente à noite ou de manhã cedo (CDC, 2015). É considerada um problema de saúde pública por ser uma das doenças crônicas que mais atinge as crianças e idosos, com uma tendência para o crescimento do número de pessoas afetadas a cada ano (Almeida, 2010). Os ataques de asma podem ser desencadeados pelo fumo de tabaco, ácaros, poluição do ar, baratas, pelo ou penas de animais, bolor, fumos, entre outros fatores (CDC, 2015; Almeida, 2010). A asma é caracterizada por uma cascata de reações que levam à obstrução aguda do fluxo do ar, ao aumento da produção de muco, hiper-reactividade brônquica e inflamação das vias aéreas. A designação de asma é dada quando ocorrem estas interações fisiológicas e também pelo surgimento dos sibilos e das dificuldades respiratórias (Clark, 2010 ; Lemanske, Busse 2010). Os sinais e sintomas da asma são difíceis de definir clinicamente porque variam de doente para doente (**tabela 1**)

Tabela 1: Sintomas da asma (adaptado de Clark, 2010)

Sintomas comuns da asma	Sintomas que podem ser associados à asma	Sintomas de asma severa
Pico do fluxo de ar entre 50% e 80% do recorde pessoal	Padrão de respiração anormal, caracterizado por expirações longas	Pico do fluxo de ar abaixo dos 50% do recorde pessoal
Tosse (com ou sem produção de muco), normalmente pior à noite ou de manhã cedo, tornando o sono difícil	Paragem respiratória temporária	Cianose
Falta de ar que piora com a prática de exercício físico ou atividade física	Postura (ombros curvados)	Alterações da consciência durante a exacerbação da asma
Retrações intercostais	Dores e aperto no peito	Taquicardia e Transpiração
Sibilos: repentinos, de natureza episódica, piores à noite ou de manhã cedo, ocorrem com o exercício e o refluxo, melhoram com medicação	“ Queimadura nasal “	Ansiedade, devida à muita dificuldade em respirar

Existem vários tipos de asma (Clark, 2010):

- **Asma infantil:** ocorre em crianças, normalmente acompanhada de sibilos, tosse e dificuldade em dormir.
- **Asma ocupacional:** devida a inalação de vapores, gases ou fumos existentes no local de trabalho.
- **Asma noturna:** não há consenso se esta é um subtipo de asma ou não pois os seus sintomas parecem dever-se a casos de asma mal controlada.
- **Asma induzida por exercício físico:** acompanhada de broncospasmos (estreitamento das vias aéreas), embora também não haja consenso se este será um subtipo de asma ou um sintoma de asma em geral.
- **Asma gestacional:** asma durante a gravidez.
- **Asma resistente ao tratamento:** asma que não responde às terapias convencionais
- **Asma induzida por aspirina:** exacerbação da asma após a toma de anti-inflamatórios não-esteróides.
- **Asma alérgica:** tipo de asma mais comum, desencadeada pela presença de um alérgeno.

Fisiopatologia da asma

A fisiopatologia da asma é caracterizada pela limitação do fluxo de ar nas vias aéreas e por inflamação das mesmas. Compreender os mecanismos que acontecem nas vias aéreas é essencial para desenvolver tratamentos bem sucedidos no controlo da asma (Clark, 2010).

A limitação do fluxo de ar nas vias aéreas não tem uma causa definida, mas está comumente associada a uma contração do músculo liso dos brônquios (contração rápida ou estreitamento das vias aéreas em resposta a bronco mediadores e a neurotransmissores). Este estreitamento das vias aéreas é também responsável pela produção dos sibilos que são característicos da asma. Este sintoma pode ser revertido facilmente pelo uso de broncodilatadores (Clark., 2010).

Outra das causas para a limitação do fluxo de ar pode dever-se a alterações microvasculares que vão dar origem a um edema ou presença de fluido nas vias aéreas. A hipersecreção de muco é outro sintoma característico da asma que se deve à secreção de muco e exsudados inflamatórios (Clark., 2010).

Vários estudos têm mostrado que existe um aumento do número das células caliciformes no epitélio das vias aéreas e um aumento das glândulas submucosas que levam à hipersecreção de muco (Clark., 2010).

Antes mesmo de aparecerem sintomas da asma existem alterações estruturais das vias aéreas. A fibrose sub-epitelial dá-se quando as fibras de colagénio e proteoglicanos se formam debaixo da membrana basal. A fibrose também pode aparecer noutras membranas da via aérea. O aumento de tamanho do músculo liso das vias aéreas deve-se essencialmente à hipertrofia e hiperplasia dessas células resultando num aumento da espessura das paredes das vias aéreas. Existe também uma proliferação de vasos sanguíneos nas paredes das vias aéreas que também contribui para o aumento da sua espessura. Estas alterações estão relacionadas com a severidade da asma e neste momento a terapia convencional não consegue reverter esta situação (Clark., 2010).

A limitação do fluxo de ar é, portanto, caracterizada por contração do músculo liso dos brônquios, edema das vias aéreas, hipersecreção de muco, hipertrofia e hiperplasia.

A hiper-reatividade das vias aéreas caracteriza a tendência para a redução das vias aéreas em resposta a um estímulo, ou seja, é a probabilidade de ocorrer uma bronco constrição e a sua respetiva severidade (Clark, 2010).

Vários estudos mostram que a inflamação das vias aéreas pode acontecer mesmo sem limitação das vias aéreas. Esta é independente do tipo de asma e pode ocorrer em qualquer parte do sistema respiratório, embora tenha maior impacto nos brônquios. A inflamação das vias aéreas ocorre por ação de imunoglobulinas, mastócitos, basófilos, mediadores químicos e prostaglandina D2 (Clark,2010).

A imunoglobulina (Ig) é uma molécula do sistema imunitário que se liga a um antígeno e serve como sinalizador, para que outras células do sistema imunitário combatam o

invasor ao qual a imunoglobulina se ligou. A produção de imunoglobulinas é complexa. Quando um antígeno entra no organismo, os linfócitos T chegam ao local e verificam o que é necessário para combater esse dado antígeno. Os linfócitos usam células Th que libertam citocinas, que por sua vez estimulam os linfócitos B. São os linfócitos B que produzem as imunoglobulinas que se ligam ao antígeno. (Clark, , 2010).

Existem várias classes imunoglobulinas: IgM, IgG, IgA e IgD. No caso da asma, a imunoglobulina envolvida é a IgE. Quando ocorre libertação de IgE diz-se que o antígeno que provocou a sua libertação é um alérgico e que o indivíduo é alérgico a esse mesmo antígeno (ou a compostos constituídos por esse antígeno). Nestes indivíduos, a IgE tem sido encontrada em circulação juntamente com células inflamatórias, como basófilos, ou em mastócitos (Clark, 2010 ; Lemanske, Busse 2010)

Enquanto os basófilos se encontram na circulação sanguínea, os mastócitos estão nos tecidos. Quando existe produção de IgE e se liga a estes tecidos diz-se que essas células (mastócitos e basófilos) estão marcadas. Quando o indivíduo entrar em contacto com o alérgico num segundo contato, vai ser desencadeada uma resposta alérgica (Clark, 2010).

O mediador químico mais conhecido libertado pelos mastócitos é a histamina. A histamina liga-se aos seus recetores específicos e desencadeia sintomas alérgicos, como inchaço, espirros e comichão. Outros mediadores químicos são os cisteinil leucotrienos, que têm o mesmo efeito que a histamina, mas mais potentes. A inibição dos cisteinil leucotrienos é a única que mostra uma melhoria nos sintomas da asma e nos valores da função pulmonar. Outros mediadores são as quimiocinas que são expressas nas células epiteliais das vias aéreas, sendo responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias nas vias aéreas. Quimiocinas ativadas pelo timo e quimiocinas derivadas de macrófagos recrutam células Th2. (Clark, 2010).

As citocinas são proteínas de sinalização que permitem a comunicação celular durante a resposta inflamatória da asma. Medindo os níveis de citocinas podemos determinar a gravidade da resposta inflamatória. Podem ser divididas em quatro grupos: limfoquinas,

citoquinas pró-inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas. A regulação de citocinas é um dos principais alvos da terapêutica corticosteróide e dos agentes imunossupressores de células T na asma. (Clark, 2010).

A prostaglandina D2 é um broncoconstritor derivado dos mastócitos que está envolvida no recrutamento de células Th2 para as vias respiratórias (Clark, 2010).

O GST tem um papel nas respostas inflamatórias protegendo as vias aéreas do stress oxidativo através utilização dos produtos do stress oxidativo como substratos e portanto removendo esses produtos dos tecidos onde se encontram. Se houverem mutações no gene vão influenciar a capacidade de reação da enzima e consequentemente a capacidade das vias aéreas reagirem a inflamação. Portanto este gene é importante para o estudo da asma (Brasch-Andersen et al, 2004).

O recetor β_2 adrenérgico está envolvido no relaxamento dos músculos lisos, os seus agonistas levam a broncodilatação. É portanto um alvo no tratamento da asma. Uma mutação no gene dos recetores β_2 adrenérgico pode influenciar a resposta aos tratamentos para a asma. É um dos genes portanto mais estudados na asma. (Evans, McLeod, 2003)

Desenvolvimento da asma no doente

Tem-se notado uma diminuição da taxa de mortalidade por asma havendo diferenças por grupo etário e por região em Portugal bem como da taxa de internamento, embora esta com diferenças significativas entre os grupos etários. Verificou-se também que a asma é uma doença que afeta transversalmente a população em termos dos grupos etários. Apenas 57% dos asmáticos tinham, em 2010, a sua asma controlada, que se verificou ser diferente entre os grupos socio-educacionais. Verificou-se também uma relação entre o controlo da doença e o índice de massa corporal. (Almeida, 2010)

A asma apresenta uma heterogenia a nível da sua expressão que é influenciada pela idade, sexo, situação socioeconómica, etnia, genética do doente e por interações

ambientais. Não são usadas características fisiológicas ou imunológicas para fazer um diagnóstico, mas este é feito tendo em conta principalmente os sintomas e a reação do doente à terapia (Lemanske, Busse 2010).

O desencadeamento da asma pode dever-se a vários fatores, como já foi referido anteriormente. O tratamento da asma é definido tendo em conta a gravidade e a tentativa de controlo da doença. Mas mesmo com um tratamento adequado, ainda existem muitos pacientes com a asma não controlada (Lemanske, Busse, 2010).

Quando se compara crianças com sintomas de asma com crianças saudáveis, verifica-se que nas crianças asmáticas existe um aumento do número de linfócitos, células polimorfonucleares e macrófagos, bem como um aumento dos leucotrienos B4 e C4 e da prostaglandina E2, em relação às crianças saudáveis. As crianças mais novas com sintomas de asma, ao contrário de crianças mais velhas ou adultos asmáticos, não revelaram um espessamento da membrana reticular basal nem inflamação eosinofílica. As mudanças estruturais e inflamatórias parecem dar-se apenas na idade pré-escolar. O condensado do ar exalado em crianças com asma revela um nível elevado de peróxido de hidrogénio, isoprostanos, aldeídos e nitrosina, sugerindo um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Também se verifica uma diminuição do nível de glutatión nas idades pediátrica e durante as agudizações, relevando uma baixa capacidade antioxidante (Lemanske, Busse, 2010).

Para a maioria dos doentes, os sintomas da asma começam a manifestar-se na infância. As características celulares e moleculares da asma são complexas e variáveis. Nos adultos as alterações das vias aéreas dependem da fase da asma em que o doente se encontra e do tratamento que lhe é receitado (Lemanske, Busse, 2010).

Processo inflamatório na asma

Quando um alérgeno entra nas vias aéreas, ativa os mastócitos, os basófilos e as células Th2. Estes induzem a produção de mediadores químicos (histamina, leucotrienos e citocinas) que vão ativar o sistema imunitário para combater o invasor. Como resposta a

estas atividades, dá-se o edema da parede dos brônquios e o aumento da secreção de muco (Clark, 2010).

A broncoscopia e a biópsia permitiram uma melhor compreensão da imunopatologia da asma. Com estas técnicas podem ser conhecidas as características celulares e moleculares que dão origem à fisiologia da asma. Até agora, foi possível compreender que a regulação da inflamação das vias aéreas é diferente para cada fase da doença. Mas podemos considerar a asma como um processo inflamatório Th2, no qual as células das vias respiratórias contribuem maioritariamente para a disfunção das vias aéreas (Lemanske, Busse, 2010).

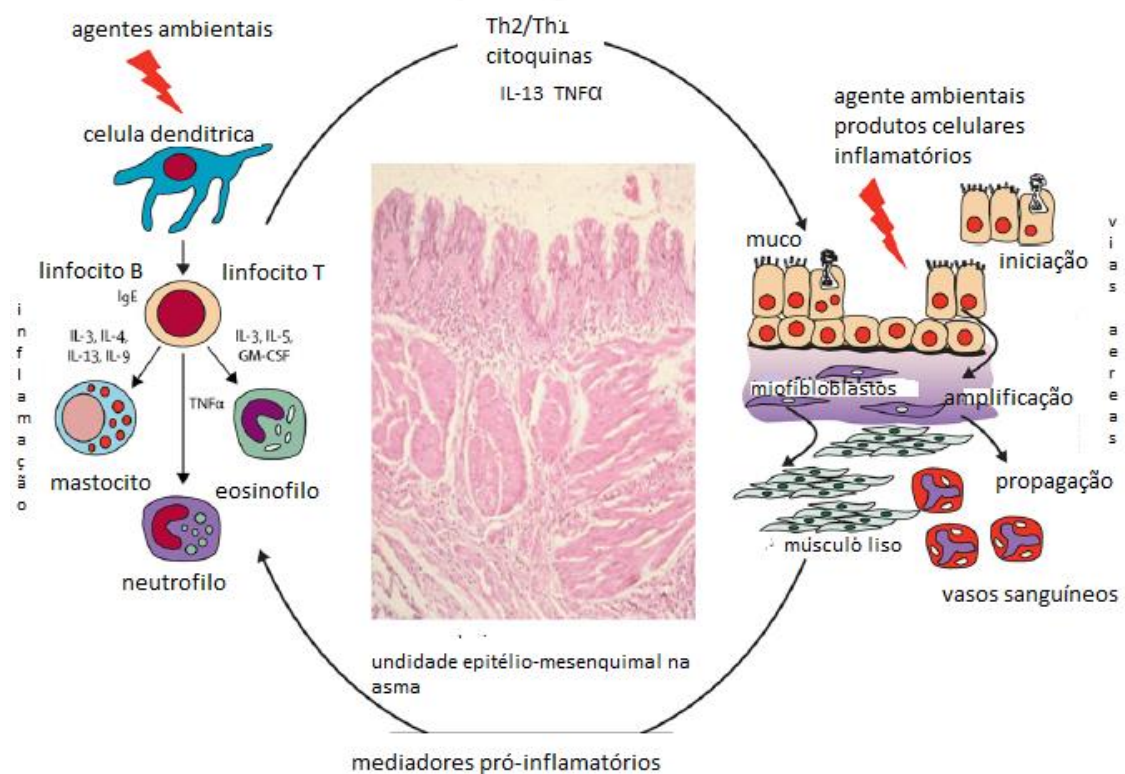


Figura 1: Resposta inflamatória e de remodelação com a ativação da unidade trófica epitélio-mesenquimatosa. Existe uma interação entre o epitélio e o mesênquima que provoca a libertação de fatores de crescimento e citocinas. Danos no epitélio conduzem à ativação de miofibroblastos, aumento do volume mesenquimal e indução de mudanças estruturais (adaptado de Lemanske, Busse, 2010).

Na reação inflamatória da asma, as interações entre IgE e alérgénio são dominantes nas patologias das vias aéreas, enquanto os mastócitos, linfócitos Th2 e eosinófilos definem as características histológicas. Existe uma cascata de citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) envolvida também nestes processos. Os mastócitos contribuem para a libertação dos mediadores da fase aguda da asma, bem como das citocinas. O aumento dos linfócitos dirigidos a Th2 aumentam o processo inflamatório pela libertação de citocinas. São estes os fatores que conduzem a uma resposta inflamatória e regulam a produção de IgE (Lemanske, Busse, 2010).

Os eosinófilos são característicos da inflamação alérgica. São recrutados para as vias aéreas pelas citocinas e quimocinas causando inflamação das vias aéreas, aumento da hiper-resposta das vias aéreas e obstrução das vias aéreas. Os eosinófilos libertam substâncias altamente inflamatórias que vão danificar as vias aéreas e causar uma inflamação persistente. Também são fonte para os leucotrienos, produtos do metabolismo oxidativo e citocinas inflamatórias (Lemanske, Busse, 2010).

O epitélio das vias aéreas também contribui para as respostas inflamatórias na asma, pois é rico em mediadores inflamatórios e de crescimento mas ao mesmo tempo também é o alvo, sofrendo danos e até perda de células. O músculo liso em asmáticos revela, por sua vez, hipertrofia e hiperplasia e pode ser fonte das citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento (Lemanske, Busse, 2010).

As glândulas mucosas e os vasos sanguíneos estão também envolvidos na histopatologia da asma. As glândulas mucosas aparecem hipertrofiadas, o que leva a libertação de muco que vai obstruir as vias aéreas. Fatores gerados no processo inflamatório da asma podem agir sobre os vasos sanguíneos, provocando um estreitamento das vias aéreas (Lemanske, Busse, 2010).

Fizeram-se vários progressos na compreensão do papel da variação genética em fenótipos humanos complexos (como por exemplo a asma) e concluiu-se que estes fenótipos não são determinados apenas por um gene mas por um conjunto de genes. Há evidências que indicam que grande parte dos polimorfismos relacionados com a asma

apenas determina o risco de desenvolver a doença dentro de um contexto dependente de fatores ambientais e de interações com outros genes e também com a fase da doença em que o portador do polimorfismo se encontra (Martinez, 2007).

Dentro dos vários polimorfismos que podem estar relacionados com a asma nesta tese vão ser estudados polimorfismos em três genes que se acredita terem implicações com a asma: *GST* (glutathione-s-transferase que tem um papel nas respostas inflamatórias e protegem as vias aéreas do stress oxidativo) e *ADRβ₂* (que está relacionado com a resposta broncodilatadora e com a resposta à medicação)

Embora hajam evidências da existência de uma relação entre alguns genes e a asma, relacionar as muitas variações genéticas e as várias características da asma não é um processo simples (Martinez, 2007).

Verificou-se também que nos últimos anos se deu um aumento do número de pessoas afetadas por doenças atópicas, indicando que o ambiente tem um papel importante no aparecimento destas doenças (Brasch-Andersen, et al., 2004).

Tratamento e controlo

Para um controlo da asma (ou crises de asma) é recomendado, além de tratar outras doenças que possam interferir com a asma, evitar o contacto com substâncias que possam desencadear uma reação de asma. Quanto ao tratamento, existem vários medicamentos que ajudam a aliviar ou mesmo terminar com os sintomas da asma. Esses medicamentos podem dividir-se em medicação a longo prazo e medicação de ação rápida. A medicação a longo prazo ajuda a reduzir a inflamação das vias aéreas, prevenindo os sintomas da asma consequentes dessa inflamação, e é basicamente constituída por corticosteróides de inalação, nebulizadores, injeções anti-IgE, agonistas β₂ inalados de longa ação e modificadores de leucotrienos. A medicação de ação rápida relaxa rapidamente os músculos à volta das vias aéreas, ajudando a um melhor fluxo de ar pelas vias aéreas, e é constituída pelos agonistas β₂ inalados de ação rápida. (National Heart Lung, and Blood Institute, 2015).

A asma é uma doença complexa multifatorial que envolve vários fatores genéticos (e ambientais) que ainda não estão completamente compreendidos. Desta forma, não é possível estudar apenas um polimorfismo ligado à doença e, por isso, neste trabalho vão ser abordados três polimorfismos (GSTM1, GSTT1 e ADR β_2) que se supõem ter uma relação na expressão e na gravidade da asma.

Glutationo-S-transferase (GST)

Considerações gerais: Como já foi dito, a asma é uma doença que se define pela inflamação das vias aéreas. A formação de espécies reativas do oxigénio tem um papel importante na inflamação. Como os antioxidantes têm um papel no desenvolvimento de várias doenças, é possível que eles possam estar envolvidos no desenvolvimento de doenças das vias aéreas. As enzimas xenobióticas de destoxificação de fase II, como a classe do GST, localizam-se principalmente no citosol e têm a função de catalisar a conjugação de substratos electrolíticos como o glutatióno (GSH) (Brasch-Andersen et al., 2004; Liang et al., 2013; Kabesc et al., 2004; Gilliland et al., 2002).

O glutatióno tem várias funções como agente antioxidante, sendo inclusivamente a não proteína mais abundante no espaço intracelular. O GSH (glutatióno reduzido) além de regenerar oxidantes, sequestra espécies reativas de oxigénio. Durante esses processos dá-se a conversão do GSH para GSSG (forma oxidada do GSH), sendo esta reduzida pelo NADPH-Glutatióno redutase. É importante para a função celular existir níveis altos de glutatióno na célula. (Marinho et al, 2007)

O GSH além de cofator para enzima como a GST é um antioxidante hidrofílico. A redução do GSH é um das principais causas da vulnerabilidade relativamente ao stress oxidativo. Os níveis de Glutatióno são regulados através do equilíbrio entre formação de GSH e gasto de GSSG. O GST catalisa o ataque da GSH aos compostos nucleofílicos contribuindo por isso o GST para a proteção do organismo contra o stress oxidativo. (Marinho et al, 2007)

As enzimas GST são enzimas de conjugação que estão envolvidas na metabolização de xenobióticos depois de estes serem ativados pelo citocromo P450. A atividade do GST resulta numa formação de um conjugado glutathiono-xenobioticos. Os polimorfismos do GSTM1 e do GSTT1 influenciam a actividade enzimática que pode resultar numa potenciação do stress oxidativo através do metabolismo do GSH. (Marinho et al, 2007)

O GST tem um papel importante nas respostas inflamatórias pois consegue remover as espécies reativas do oxigénio, usando os produtos do stress oxidativo como substratos (ou seja consegue proteger as vias aéreas do stress oxidativo). As enzimas da família GST possuem sequências semelhantes. Uma alteração genética nas enzimas da GST vai influenciar a capacidade das vias aéreas de reagirem com substâncias e vai influenciar a inflamação das vias aéreas e do desenvolvimento pulmonar. A capacidade de remoção das espécies reativas do oxigénio é determinada geneticamente e portanto diferente de pessoa para pessoa. (Brasch-Andersen et al., 2004; Liang et al. , 2013; Kabesc et al., 2004; Gilliland et al., 2002).

Polimorfismos do GST: A família de genes GST pode ser agrupada em três grandes grupos: mitocondrial, citosólico e microssomal de ligação a membrana. Identificaram-se vários genes do grupo citosólico que afetam a atividade enzimática, mas os estudos realizados focam-se nos genes *GSTT1* e *GSTM1* (que codificam para as enzimas GSTM e GSTT), pois ambos são expressos no trato respiratório e tem uma completa perda de funcionalidade se o genótipo para o gene for nulo. (Liang et al, 2013) As variações genéticas nas enzimas que detoxificam as espécies reativas de oxigénio e outros produtos produzidos pelas células inflamatórias podem contribuir para as variações que observamos após a exposição a um alérgeno. (Liang et al., 2013; Brasch-Andersen et al,2004).Segundo alguns autores poderão ter implicações na fisiopatologia de doenças como a hipertensão arterial e outras doenças, por alterarem as atividades enzimáticas, interferir com o metabolismo do GSH e potenciar o stress oxidativo. (Marinho et al, 2007)

O *GSTM1* (**Figura 2**) é um gene localizado no cromossoma 1p13.3, com vinte e uma mil duzentas e quarenta e quatro bases e possui dois alelos, um wildtype (*GSTM1*1*) e um alelo nulo não funcional (*GSTM1*0*). (Hoskins, et al, 2013;Genecards.org, 2015) Os

fenótipo em que os genes estão deletados. Estes dois genes, quando deletados, podem influenciar o desenvolvimento da asma (Brasch-Andersen et al., 2004; Rifai et al, 2014).

Estudos observaram uma relação do alelo nulo do *GSTM1* e do *GSTT1* com o desenvolvimento da asma (Brasch-Andersen et al, 2004) e outros em que não influenciava o desenvolvimento da asma. (Rifai et al,2014) .Existe, portanto, uma incerteza sobre o papel destes polimorfismos e a asma.

Um estudo revelou uma frequência significativamente maior do genótipo nulo do *GSTT1* entre os indivíduos não asmáticos (ao contrário do verificado no caso do *GSTM1* em que não existem diferenças significativas) (Rifai et al (2014). Não se verificam também diferenças entre a prevalência do *GSTT1* e *GSTM1* entre asmáticos atópicos e não atópicos nem diferenças destes POLIMORFISMOS entre asmáticos com diferentes gravidades da doença (Rifai et al (2014).

Estudos anteriores sobre GST e asma: Os estudos de Rifai et al (2014) realizados na população egípcia concluíram que não existe diferença nos asmáticos e que as frequências neste gene poderão ser afetada por diferenças étnicas mas não apresentam resultados para isso e Liang et al (2013) concluíram que existe uma diferença significativa na frequência dos alelos *GSTT1* e *GSTM1* entre diferentes grupos étnicos e entre asmáticos adultos e crianças quando comparados com controles. Os genes envolvidos na asma, ou os seus polimorfismos, podem ser diferentes entre os vários grupos étnicos, explicando essas diferenças. Quando analisaram a população por grupos etários, verificaram que no caso do *GSTM1* nulo não se conseguiam observar diferenças (tanto em crianças como em adultos aumentava o risco de asma) mas no caso do *GSTT1* nulo apenas os adultos mostravam uma associação entre o gene e a asma.

Rifai et al (2014) compararam a frequência dos alelos nulos do *GSTT1* e *GSTM1* entre pessoas com asma de diferente gravidade e não encontraram nenhuma relação. Também não encontraram diferenças na frequência dos polimorfismos do *GSTT1* e *GSTM1* entre asmáticos atópicos e não atópicos (embora num estudo anterior (Karam et al, 2012)

visto pelos autores tenha relevado uma prevalência do alelo nulo do *GSTM1* em asmáticos atópicos com diferenças significativas).

O estudo de Hanene et al (2007) que estudou crianças tunisinas asmáticas e verificou que o alelo nulo do *GSTM1* era significativamente mais frequente nas crianças asmáticas e que o alelo nulo do *GSTT1* estava associado significativamente as crianças asmáticas atópicas

O estudo de Hoskins et al (2013) analisou em adultos americanos a relação entre a frequência alélica do *GSTM1* e a asma desencadeada por alergénios. Neste estudo os asmáticos com o genótipo wildtype eram mais reativos a certos alergénios. Desta forma supõe-se que os indivíduos com o alelo nulo para o *GSTM1* possam ter um mecanismo inibitório da inflamação, ou seja, o *GSTM1* pode ter um papel na inflamação no caso dos asmáticos e não um papel protetor, como outros estudos anteriores sugeriam. Ou seja neste estudo encontraram que o *GSTM1* wildtype influencia a inflamação neutrofílica em indivíduos com asma atópica. Ao contrário do que foi anteriormente descrito este estudo não releva um papel antioxidante do *GSTM1* em asmáticos atópicos.

Kabesch et al (2004) estudou crianças alemãs expostas ao fumo de tabaco e verificou que quando possuíam o alelo *GSTM1* nulo, eram significativamente mais suscetíveis à asma, pieira e tosse enquanto para o alelo nulo do *GSTT1* apenas a pieira e a tosse se mostraram significativamente aumentadas, mostrando portanto uma interação entre estas enzimas e asma. Também se pode concluir que existe uma interação entre as enzimas GST e os componentes do fumo do tabaco, no caso das crianças com alelo nulo para o *GSTM1*, que é suportado pelo facto de serem encontrados maiores danos celulares nos pulmões de indivíduos fumadores com o genótipo nulo para o *GSTM1*. Quando a função do *GSTM1* está diminuída, existe um maior número de danos no DNA e o mesmo se verifica nos indivíduos com uma função diminuída do *GSTT1*.

São os alelos nulos tanto do *GSTM1* como do *GSTT1* que afetam a asma e o seu desenvolvimento nos indivíduos. Também se verificou um aumento da asma (não

significativo) em crianças com alelo nulo do *GSTM1* quando expostas, ainda no útero, ao fumo do tabaco. Os indivíduos com genótipo nulo do GST têm um maior risco de desenvolver asma quando exposto ao fumo do tabaco. As crianças com *GSTT1* nulo revelaram neste estudo, ao contrário de outros, uma deficiência da função pulmonar (Kabesch et al, 2004).

No estudo realizado por Holla et al, (2006) numa população checa foi observado que a frequência genotípica dos alelos nulos do GST (tanto *GSTM1* como *GSTT1*) era semelhante entre indivíduos asmáticos e não asmáticos. Também quando estudados em conjunto, ou seja o mesmo indivíduo possuir alelo nulo tanto para o *GSTM1* como para o *GSTT1*, se verificou não existir uma diferença significativa entre os indivíduos asmáticos e os não asmáticos. Contudo quando comparando os indivíduos que possuíam as duas cópias do alelo nulo do *GSTM1*, verificou-se que apresentavam uma pior função pulmonar (significativamente relevante). Não se verificou neste estudo nenhuma diferença na frequência dos genótipos do *GSTM1* e *GSTT1* quando se comparou os asmáticos pela gravidade da doença.

No estudo de Gilliland et al, (2002) em crianças americanas verificaram que o alelo nulo do *GSTM1* estava relacionado com a função pulmonar. As crianças asmáticas de ascendência caucasiana (com alelo nulo do *GSTM1*) analisadas revelaram uma pior função pulmonar (com diferenças significativas) do que as crianças não asmáticas. Observaram-se também neste estudo diferenças significativas entre os grupos étnicos, sendo entre os caucasianos com o alelo nulo do *GSTM1* que se verifica uma maior discrepância da função pulmonar comparando asmáticos e não asmáticos.

O gás de cozinha é uma fonte de dióxido de nitrogénio que é altamente oxidante. Desta forma, Amaral et al (2014) estudou se haveria alguma relação entre a utilização do gás de cozinha e a resposta brônquica. Verificou neste estudo que os indivíduos com o alelo nulo do *GSTM1* apresentam uma resposta brônquica significativamente maior quando cozinham com gás em relação aqueles que usam apenas a eletricidade. Este estudo vai portanto reafirmar a relação entre os antioxidantes e os danos nas vias aéreas.

Recetor β_2 adrenérgico

Considerações gerais: Um dos sintomas da asma é a pieira e a medicação para aliviar este sintoma inclui β agonistas. Estudos feitos sugerem que os polimorfismos do gene do recetor β_2 adrenérgicos estão relacionados com a resposta broncodilatadora (Wu et al, 2015).

O recetor β adrenérgicos pertence a uma família de recetores transmembranares que se acoplam à proteína G e que são alvos das catecolaminas e que se expressam por todo o corpo. Possuem uma ligação a um agonista que vai causar uma reação. No trato respiratório o recetor β_2 que se apresenta-se em maior numero e consequentemente o mais estudado na asma. Estão envolvidos no relaxamento dos músculos lisos, nos pulmões os agonistas do recetor β_2 levam à broncodilatação. É um dos alvos para a terapia com agonistas no tratamento da insuficiência cardíaca e da asma. Este recetor apresenta polimorfismos que revelaram alterar a expressão, a ligação do ligando, o acoplamento ou fenótipos de regulação. (Gupta et al, 2015) Estudos também mostraram que alguns polimorfismos possuem um efeito significativo na resposta aos tratamentos. (Evans, W.; Mcleod, H., 2003; Gupta et al, 2015)

Os agonistas dos recetor β_2 adrenérgico (ou catecolaminas) promovem a ligação do recetor a proteína G através da libertação de subunidades da proteína (Gs e $G\beta\gamma$). A subunidade Gs ativa a adenililciclase gerando AMP_c (monofosfato cíclico de adenosina) que vai por sua vez regenerar a proteína cinase A que fosforila mediando o relaxamento. As subunidades $G\beta\gamma$ recrutam a proteína G ligada ao recetor da cinase 2 que fosforila o recetor β_2 adrenérgico resultando na dessensibilização do recetor. A fosfatase A desfosforila o recetor β_2 adrenérgicos e a proteína volta a membrana pronta para se ligar ao agonista (Gupta et al, 2015; Karam et al, 2013).

Na base da fisiopatologia da asma e da sua gravidade poderá estar a resposta à terapêutica com β_2 miméticos porque embora os agonistas do recetores β_2 adrenérgico sejam usados para aliviar os sintomas da asma, a sua utilização repetida pode fazer com

que os seus efeitos sejam cada vez menores (alterando o relaxamento dos músculos e o tempo da broncodilatação). (Gupta et al, 2015)

Polimorfismos do recetor β_2 adrenérgico: O recetores β_2 adrenérgico pertence ao grupo dos recetores que se ligam a proteína G que incluem vários recetores (alfa 1 A, Alfa 1B, Alfa 1D, Alfa 2 A, Alfa 2 B, Alfa 2 C, Beta 1, Beta 2 e Beta 3.) e localizam-se essencialmente no sistema nervoso central, coração, rim e músculos onde estão envolvidos no relaxamento muscular (como e o caso da broncodilatação). O gene do recetor β_2 adrenérgico localiza-se no cromossoma 5q31-q32 e tem três mil quatrocentas e quarenta e três bases. (genecards.org, 2016; Karam, 2013)

Polimorfismos no gene do recetor β_2 adrenérgico são determinantes para a função do recetor e ocorrem normalmente na população. Os dois polimorfismos mais conhecidos são a substituição da arginina por glicina (Gly16) e do ácido glutâmico por glutamina (Glu 27). O polimorfismo deste gene estudado nesta tese é um polimorfismo de nucleótido simples (SNP) na posição 46 do gene que substitui o décimo sexto aminoácido de uma arginina para uma glicina (Arg16Gly) alterando a função do recetor. Este polimorfismo no recetor β_2 adrenérgico dá origem a três genótipos diferentes: AA (quando é homozigótico para a adenina na posição 46), AG (quando tem adenina e guanina na posição 46) e GG (quando ambas têm guanina na posição 46) (Karam, 2013)

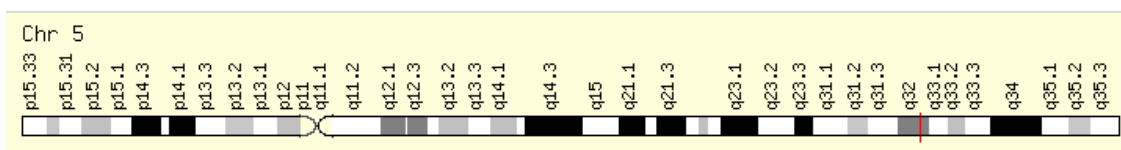


Fig. 4 Localização do gene do recetor β_2 adrenérgico (Genecard.org, 2016)

Estudos anteriores sobre ADB_2 e asma: Um estudo realizado in vitro verificaram que as células homozigóticas para a Gly16 (GG) apresentam uma baixa regulação na presença de agonistas, enquanto os homozigóticos para o Glu27 são relativamente resistentes. A relação entre estes resultados e a asma tem sido estudada in

vivo mas sem resultados conclusivos. O aspeto mais importante para a asma é a observação da tolerância a medicamentos β agonistas inalados pode ser determinado pelo polimorfismo do recetor. (Green et al, 1995)

No estudo de Taylor et al (2000) realizado em asmáticos com a doença ligeira a moderada verificou-se que os indivíduos AA quando tratados com salbutamol (um agonista do recetor β_2) apresentavam um agravamento significativo da asma do que quando tratados com o placebo, enquanto para os indivíduos que apresentavam outros polimorfismos não se verificou em nenhum dos tratamentos um declínio significativo da doença. Sugerindo este estudo que o polimorfismo AA esta ligado aos efeitos adversos do tratamento dos asmáticos com salbutamol. Ao pesquisar estudos anteriores como por ex (Green et al, 1995) encontraram estudos contraditórios, que em os indivíduos GG é que apresentavam efeitos adversos ou que os indivíduos AA quando tratados com salbutamol apresentavam uma melhoria do estado da asma. Uma das hipóteses dada e uma maior predisposição para efeitos adversos mediados pelos recetores β_2 quando submetidos a uma dose cronica ou a substituição na posição 16. Mas Taylor et al (2000) também verificou que quando os asmáticos eram tratados com outro agonista do recetor β_2 (salmeterol) não verificaram diferenças significativas em relação ao tratamento em nenhum dos genótipos.

Hancox et al (1998) estudaram os efeitos do tratamento cronico com β agonistas por genótipo, observaram que houve diferenças significativas na resposta durante o tratamento com fenoterol, os indivíduos GG não apresentaram um aumento na resposta brônquica ao tratamento como os outros genótipos.

Wechsler et al (2009) e Bleecker (2010) nos seus estudos não conseguiram encontrar diferenças significativas na resposta a um β -agonista (salmeterol) entre os polimorfismos do *ADB₂*.

No estudo de Leite et al (2015) feito em crianças e adolescentes brasileiros verificou-se que os asmáticos de peso normal possuíam uma maior frequência significativa do alelo A (arginina na posição 16 do gene dos recetores β_2) sugerindo que pode estar

relacionado com o desenvolvimento da asma. Na população com excesso de peso no entanto verificou-se os asmáticos apresentavam uma tendência para uma maior frequência do alelo G (glicina na posição 16 do gene).

No estudo de Karam et al (2013) em que estudaram crianças egípcias com asma noturna conseguiram observar uma relação entre o polimorfismo dos recetores β_2 e a asma. Os indivíduos com genótipo GG apresentavam uma maior tendência significativa para apresentarem asma noturna comparando com os outros genótipos. A causa pode ser que a substituição da arginina pela glicina vai provocar uma desregulação dos recetores B_2 adrenérgicos e consequentemente aumentar a sensibilidade dos brônquios.

Turki et al (1994) estudou indivíduos asmáticos adultos americanos caucasianos e hispânicos com asma noturna e sem asma noturna e observou que o grupo de asmáticos noturnos tinham uma frequência significativamente maior do alelo G do que os asmáticos que não possuíam asma noturna. Ou seja a presença do alelo G nestes asmáticos vai influenciar a doença.

O estudo de Wu et al (2015) realizado em crianças americanas não conseguiu encontrar nenhum efeito protetor na substituição de aminoácidos na posição 16 do gene dos recetores β_2 adrenérgicos em crianças caucasianas e africanas. No entanto o genótipo do recetor β_2 adrenérgico pode influenciar a gravidade de doenças respiratórias como a asma, bem como a resposta a terapia.

Os estudos de Gupta et al (2015) focaram-se na ressensibilização dos recetores β_2 adrenérgicos (ou seja a defosforilação dos recetores pela fosfatase 2A). Estudaram células do músculo liso das vias aéreas de não asmáticos e de asmáticos de cadáveres humanos. Concluíram que a ressensibilização dos recetores β_2 esta inibida em asmáticos e que quando desregulada contribui para o desenvolvimento de doenças.

Tan et al (1997) estudaram a capacidade de dessensibilização aos broncodilatadores em asmáticos adultos com asma moderadamente severa e observaram que os indivíduos GG eram significativamente mais suscetíveis (a sofrerem uma dessensibilização do

broncodilatadores) do que os indivíduos AA. No entanto Martinez et al (1997) em crianças americanas e Lima et al (1999) no seu estudo sobre resposta de asmáticos com asma moderadamente severa ao albuterol (um β -agonista) observaram que os indivíduos AA respondiam significativamente melhor ao tratamento do que indivíduos com os outros polimorfismos. Estas observações sugeriram a possibilidade de que os efeitos a longo termo do tratamento para o controlo da asma com medicamentos β agonistas pode ser determinado, pelo genótipo do adrenoreceptor β_2 de cada individuo.

Objetivos

Este trabalho teve com objetivo estudar a influência dos polimorfismos genéticos relacionados com a broncodilatação ($ADR\beta_2$) e com a capacidade antioxidante dos pulmões (*GSTM1* e *GSTT1*) na fisiopatologia da asma.

Materiais e Métodos

Populações estudadas:

Foram estudados cento e trinta e cinco asmáticos (47 homens e 88 mulheres) seguidos na consulta de ImunoAlergologia do Hospital de Santa Maria – Centro Hospital Lisboa Norte pela Doutora Margarida Cortez. Todos os doentes assinaram um consentimento informado aceitando assim fazer parte deste estudo. O diagnóstico da asma foi efetuado recorrendo as linhas de orientação do “Global Initiative for Asthma” (GINA) tendo em conta os seguintes sintomas: pieira recorrente, tosse com agravamento noturno, dispneia, aperto torácico recorrente, dificuldade respiratória e cansaço. Foi também tida em consideração a história familiar de a asma e a existência de outras doenças atópicas relacionadas com a asma. Também se recorreu a técnicas de avaliação funcional respiratória (FEV1 e PEF) para se fazer confirmação do diagnóstico da asma. Os asmáticos para serem aceites neste projeto tinham que ter a asma controlada e não apresentar mais nenhuma doença inflamatória, doença respiratória, oncológica, hepática, serem fumadores ou não aderentes a terapêutica.

O grupo de controlo foi constituído por duzentos e oitenta e oito dadores (171 mulheres e 117 homens) de sangue provenientes do Instituto Português do Sangue (Lisboa) e que não apresentam a doença.

Extração do ADN genómico:

A partir do sangue total foi realizada a extração de ADN utilizando o método de salting-out adaptado do método de Lahiri D.K. e Nurnberger Jr J.I 198, tendo como alterações a utilização de TKM X-100 (2.5% (v/v) de Triton X-100 em tampão TKM 1); IGEPAL (CA 630-Sigma) em substituição do TKM 1 antes da 1ª centrifugação e a não colocação do ADN em etanol a 70% seguida de centrifugação depois da precipitação do ADN.

Quantificação de ADN:

O ADN obtido de dadores e de doentes asmáticos foi quantificado em ng/μl e observou-se a sua pureza por método espectrofotométrico através de um espectrofotómetro (NanoDrop® ND-2000) que analisou os comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Glutathione-S-transferase:

A identificação destes dois polimorfismos (GSTM1 e GSTT1) foi realizada em simultâneo através da técnica PCR- Multiplex. Inicialmente pipetou-se para um eppendorf 200ng de ADN genómico previamente quantificado e adicionamos água desionizada até perfazer 10μl (para cada ADN a analisar). Seguidamente colocou-se o eppendorf no termociclador durante dois minutos a 94°C para conduzir a desnaturação do ADN (Hot Start). Entretanto noutra eppendorf preparou-se uma mix adicionando (por cada ADN a analisar) 25μl de DreamTaq Green PCR Mastermix, 1 μl de cada primer (P1, P2, P3, P4, P5), 7,5μl de água desionizada e 2,5μl de DMSO (dimetilsulfóxido). Depois do Hot Start adicionamos aos eppendorf 40μl de mix que entretanto foi preparado. Colocou-se novamente os tubos no termociclador submetendo-os a 40 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C e ainda uma extensão de 5 minutos a 72°C. Neste protocolo utilizamos 5 primers. Os primers 1 e 2 são específicos para o GSTM1 e para o GSTM4 com as seguintes sequências respetivamente 5' – GCCATCTTGTGCTACATTGCCCCG – 3' e 5' – ATCTTCTCCTCTTCTGTCTCCCC – 3' . (O GSTM4 vai servir de controlo para a amplificação do ADN pois não possui polimorfismos). O primer 3 é específico para o GSTM1 e possui as sequências 5' – TTCTGGATTGTAGCAGATCATGCCC – 3' . Os primers 4 e 5 são específicos para o GSTT1 e possuem as seguintes sequências respetivamente 5' – TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC – 3' e 5' – TCACCGGATCATGGCCAGCA – 3' .

Submeteu-se o produto do PCR a uma eletroforese em gel de agarose (3% m/v de agarose) com uma corrente constante de 100V durante 120 minutos

Ao analisar o produto do PCR, depois de submetido a eletroforese, no transiluminador observam-se 3 bandas uma com 230 pares de bases, resultante da ação do primer 1 e 3 (que vai identificar a sequência do GSTM1), uma banda com 157 pares de bases

resultante da ação dos primers 1 e 2 (que identifica a sequência do GSTM4) e uma banda com 480 pares de bases resultante da ação dos primers 4 e 5 (que identifica o GSTT1)

Recetor β 2 adrenérgico ADR β 2

Para analisar este polimorfismo recorreremos mais uma vez a técnica de PCR. Começa-se por pipetar 200ng do ADN a analisar num eppendorf e adicionar água desionizada até perfazer 10 μ l (para cada ADN a analisar). Submete-se essa solução a um Hot Start (um ciclo de 2 minutos a 94°C no termociclador). Em seguida prepara-se uma mix juntando num eppendorf (por cada ADN a analisar): 12,5 μ l de DreamTaq Green PCR Mastermix, 0,5 μ l de água desionizada e 1 μ l de primer forward com a sequência 5'-CCTTCTTGCTGGCACCCCAT- 3' e 1 μ l de primer reverse com a sequência 5'-GGAAGTCCAAAACCTCGCACCA- 3' . Em seguida adiciona-se a cada eppendorf com o DNA submetido a hotstart 15 μ l da mix preparada e voltamos a colocar os eppendorfs no termociclador. Submete-se os eppendorfs a trinta e cinco ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C e 45 segundos a 72°C. Depois do PCR recorre-se a um gel de eletroforese 2% (m/v) de agarose para confirmar a amplificação do ADN. Os ADNs que amplificaram são seguidamente submetidos a uma digestão. Num eppendorf adiciona-se 8,5 μ l de ADN amplificado com 18,5 μ l de água desionizada, 2 μ l de green buffer e 1 μ l de enzima de restrição NcoI. Os eppendorfs são colocados no termociclador e submetidos durante 5 minutos a 37°C e 15 minutos a 65°C. originadas pela digestão

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do software IBM SPSS Statistics 20 e no Primer of Biostatistics 5.0 estabelecendo-se o nível de significância o $p < 0.05$. No caso dos dados discretos foi utilizado o teste de chi quadrado (X^2) de Pearson, para confirmar se as populações estariam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e avaliar se existem diferenças na distribuição das frequências genotípicas e alelicas. Os riscos foram calculados utilizando o Odds Ratio (OR) com os intervalos de confiança em 95%.

Resultados

Os resultados obtidos derivaram de cento e trinta e cinco asmáticos que corresponderam aos critérios de seleção mencionados nos materiais e métodos e dos duzentos e oitenta e oito controlos de sangue que serviram como grupo controlo.

Para o gene $ADR\beta_2$ conseguiu-se genotipar eficazmente oitenta e quatro asmáticos e noventa e um controlos. Para os genes $GSTT1$ e $GSTM1$ conseguimos genotipar sessenta e dois asmáticos e noventa e quatro controlos.

Não foi possível genotipar todos os controlos e todos os asmáticos pois alguns quando foi quantificado o ADN não apresentaram uma boa quantificação para ser amplificado por PCR além disso não foi possível amplificar todas as amostras através do PCR e algumas amostras depois de amplificadas não apresentaram um resultado claro.

Características da população estudada

Ao comparar o grupo controlo e o grupo de doentes asmáticos verificou-se que não existia uma diferença significativa na variável género ($P=0.253$) mas a variável idade apresentava diferenças significativas ($P < 0.001$).

Tabela 2 – Características da amostra estudada.

	Controlo	Asma	P-value
Feminino	171 (59.4%)	88 (65.2%)	0.253
Masculino	117 (40.6%)	47 (34.8%)	
Idade (anos)	(288) \pm 43.66	(135) \pm 37.65	<0.001[†]
< 15	0 (0%)	16 (12%)	<0.001
15-30	54 (18.8%)	37 (27.8%)	
> 30	234 (81.3%)	80 (60.2%)	
Atópico	n.a.	112 (84.2)	n.a.
Controlada	n.a.	96 (72.2)	n.a.

P-value, qui-quadrado; [†], t-teste n.a., não aplicável

O género feminino predomina em ambos os grupos sendo no grupo controlo 59.4% da população e na população de doentes asmáticos 65.2% embora não significativo. Em relação à variável idade a população com idade superior a 30 anos predomina em ambos os grupos mas tem uma maior predominância significativa no grupo controlo onde representa 81.3% da população estudada (contra 60.2% na população de asmáticos) seguida pela faixa etária [15-30anos] onde os asmáticos predominam sendo 27.8% (na população controlo esta faixa etária atinge os 18.8%) e por ultimo a faixa [< 15 anos] que compõe 12% da população de asmáticos (contra 0% no grupo controlo). No grupo dos asmáticos apurou-se também que 84.2% apresentavam asma atópica e que 72.2% tinham a doença controlada.

ADRβ₂

Para este polimorfismo do gene (*ADRβ₂*) conseguimos genotipar com sucesso 91 controlos e 84 asmáticos

Não existem diferenças significativas nos genótipos quando comparamos controlos e asmáticos em relação ao gene *ADRβ₂* (P= 0.274)

Em relação aos alelos também não existem diferenças significativas entre controlos e asmáticos (P=0.071)

Tabela 3: Distribuição dos genótipos do *ADRβ₂* (*rs1042713*) entre asmáticos e controlos.

<i>ADRβ₂</i>	Controlos (N=91)	Asma (N=84)	P-Value
AA	23 (25.3%)	21 (25.0%)	0.274
AG	61 (67.0%)	61 (72.6%)	
GG	7 (7.7%)	2 (2.4%)	
A	107(58.8%)	103 (61.3%)	0,071
G	75 (41.2%)	65 (38.7%)	

P-Value, Qui-quadrado

O genótipo heterozigótico (AG) do gene predomina em ambos os grupos estudados (embora sem diferenças significativas) sendo ligeiramente superior no grupo dos

asmáticos (72.6%) do que no grupo controlo (67%), sendo seguido pelo genótipo AA (sensivelmente de 25% em ambos os grupos) e o genótipo que apresenta menor frequência em ambos os grupos e o GG (que apresenta uma frequência de 7.7% no grupo controlo e de 2.4% no grupo de asmáticos).

Quando analisamos as frequências de cada alelo individualmente verificamos que também não existem diferenças significativas sendo o alelo A o mais frequente em ambos os grupos atingindo os 58.8% da população do grupo controlo e 61.3% no grupo dos asmáticos. O alelo G está presente nos restantes 41.2% e 38.7% respetivamente.

HWE no grupo ADRB2: Em relação ao grupo de doentes asmáticos não está em equilíbrio de HWE ($p=0.000$). Em relação ao grupo de controlos não está em equilíbrio de HWE ($p=0.028$)

Em relação ao grupo de asmáticos analisados com sucesso (84) verificamos que 58 tinham a asma controlada e em 26 a asma não era controlada. Também observamos que em 75 a asma tinha uma componente alérgica e em apenas 9 a asma não era alérgica.

Quando comparamos no grupo de asmáticos os que possuíam a asma controlada e não controlada não encontramos diferenças significativas ($P=0.592$).

Também não verificamos diferenças significativas quando comparamos os asmáticos em que a doença tinha uma base alérgica com aqueles que não tinham alergia ($p=0.338$).

Em relação aos alelos também não foram encontradas diferenças significativas nem entre os asmáticos com a doença controlada e não controlada ($P=0.896$) nem entre os asmáticos alérgicos e não alérgicos ($P=0.453$)

Tabela 4: Distribuição dos genótipos do $ADR\beta_2$ (*rs1042713*) entre asmáticos alérgicos e não alérgico, controlados e não.

$ADR\beta_2$	Controlada (N= 58)	Não controlada (N=26)	P-Value	Alérgica (N=75)	Não Alérgica (N=9)	P-Value
AA	15 (25.9%)	6 (23.1%)	0.592	17(22.7%)	4(44.4%)	0.338
AG	41 (70.7%)	20 (76.9%)		56(74.7%)	5(55.6%)	
GG	2 (3.4%)	0 (0%)		2 (2.7%)	0 (0%)	
A	71(61.2%)	32(61.5%)	0.896	90 (60%)	13(72.2%)	0.453
G	45 (38.8%)	20 (38.5%)		60 (40%)	5(27.8%)	

P-Value, Qui-quadrado

O genótipo AG apresenta uma maior frequência (embora não significativa) tanto no grupo em que a asma esta controlada (70.7) como no grupo que apresenta a asma não controlada (76.9), embora esta seja ligeiramente maior no ultimo grupo. O genótipo AA apresenta uma maior frequência (não significativa) no grupo da asma controlada (25.9) do que no grupo que não tem a asma controlada (23.1). Quanto ao genótipo GG foi nulo no grupo da asma não controlada e teve uma baixa frequência (3.4%).

O alelo A é o mais frequente (embora não significativo) em ambos os grupos e com uma expressão muito semelhante (61.2% no grupo com a asma controlada e 61.5 no grupo com a asma não controlada). O alelo G também apresenta valores muito aproximados em ambos os grupos (38.8% no grupo com a asma controlada e 38.5 no grupo em que a asma não estava controlada).

Quando comparamos os doentes com asma alérgica com aqueles em que a asma não é alérgica também verificamos que o genótipo AG é o mais frequente (embora não significativo) em ambos grupos mas atinge uma maior percentagem no grupo dos asmáticos alérgicos atingindo os 74.7% (enquanto que no grupo dos asmáticos não alérgicos atinge os 55.6%). O genótipo AA é o segundo mais frequente (não significativamente) em ambos os grupos sendo mais frequente no grupo de asmáticos não alérgicos onde representa 44.4% do grupo (contra 22.7% no grupo dos asmáticos alérgicos). O genótipo GG é o menos frequente não tendo qualquer expressão no grupo dos asmáticos não alérgicos e sendo apenas 2.7% do grupo de asmáticos alérgicos.

O alelo A é o mais frequente (embora não significativo) em ambos os grupos sendo mais frequente no grupo de asmáticos não alérgicos (72.2%, contra 60% no grupo de asmáticos alérgicos). O alelo G possui uma maior expressão no grupo dos asmáticos alérgicos (40%, sendo apenas de 27.8 no grupo de asmáticos não alérgicos).

GSTM1

Para este polimorfismo do gene *GSTM1* conseguimos obter com sucesso o genótipo de 94 controlos e de 62 asmáticos.

Analisando a frequência dos polimorfismos deste gene (*GSTM1*) não conseguimos obter diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo dos asmáticos ($P=0.740$)

Tabela 5: Distribuição dos genótipos do *GSTM1* entre asmáticos e controlos.

<i>GSTM1</i>	Controlo (N=94)	Asma (N=62)	P-Value
Nulo	49 (52.1%)	34 (54.8%)	0.740
Não Nulo	45 (47.9%)	28 (45.2%)	

P-Value, Qui-quadrado

O genótipo nulo deste polimorfismo do *GSTM1* é o mais frequente (embora não significativo) em ambos os grupos representando 54,8% do grupo dos asmáticos e 52.1% do grupo controlo. O genótipo não nulo esta presente em 47.9% do grupo controlo e em 45.2% do grupo de asmáticos.

Dos 62 asmáticos analisados com sucesso para este gene verificamos que em 42 a asma era controlada e que em 18 a asma não estava controlada. Quando distinguimos entre a asma alérgica e não alérgica observamos que 53 possuíam asma com uma componente alérgica e em apenas 7 a asma não era alérgica.

Verificamos que para este gene não existe diferenças significativas entre os que tem a asma controlada e os que a asma não esta controlada ($P=0.167$). Também não

encontramos diferenças significativas quando distinguimos entre se a asma tem uma componente alérgica ou não ($P=0.162$)

Tabela 6: Distribuição dos genótipos do *GSTM1* entre alérgicos e não alérgicos, controlados e não

<i>GSTM1</i>	Controlada (N=42)	Não controlada (N=18)	P-Value	Alérgica (N=53)	Não Alérgica (N=7)	P-Value
Nulo	25 (59.5%)	7 (38.9%)	0.167	30(56.6%)	2(28.6%)	0.162
Não Nulo	17 (40.5%)	11 (61.1%)		23(43.4%)	5(71.4%)	

P-Value, Qui-quadrado

No grupo que tem a asma controlada observou-se que o genótipo nulo tem uma maior frequência (59.5%, contra 40.5% do genótipo não nulo) embora não significativa. No grupo da asma não controlada o genótipo não nulo tem uma maior frequência atingindo 61.1% da população, enquanto que o não nulo apenas esta presente em 38.9% do grupo embora estas diferenças não tenham sido significativas.

No grupo da asma alérgica o genótipo nulo tem uma maior frequência (56.6%) do que o genótipo não nulo (43.4%) embora sem significância. Contrariamente no grupo da asma não alérgica o genótipo não nulo tem uma maior frequência (71.4%) (sem significância) do que o genótipo nulo (28.6%).

GSTT1

Para o polimorfismo do gene *GSTT1* foram analisados com sucesso 91 controlos e 62 asmáticos.

Conseguimos achar uma diferença significativa ($P=0.024$) entre os controlos e os asmáticos para este polimorfismo no gene.

Tabela 7: Distribuição dos genótipos do *GSTT1* entre asmáticos e controles.

<i>GSTT1</i>	Controlo (N=91)	Asma (N=62)	P-Value
Nulo	29 (31.9%)	31 (50.0%)	0.024
Não Nulo	62 (68.1%)	31 (50.0%)	

P-Value, Qui-quadrado

No grupo controlo o genótipo não nulo foi significativamente frequente com 68.1% da população do grupo controlo a apresentar este genótipo, tendo o genótipo nulo sido observado em 31.9% da população. No grupo dos asmáticos os genótipos tiveram uma distribuição igual pela população estando cada um presente em 50% da população.

Dentro do grupo dos asmáticos observamos que dos 62 asmáticos analisados, 42 tinham a asma controlada e 18 não tinham a asma controlada. Observou-se também que 53 tinham uma asma com uma componente alergia e que em 7 a asma não era alérgica.

Não se verificaram diferenças significativas entre o grupo de asmático com a asma controlada e asmáticos sem a asma controlada ($P=0.464$) mas houve diferenças significativas quando comparamos o grupo com asma alérgica com os não alérgicos ($P=0.035$).

Tabela 8: Distribuição dos genótipos do *GSTT1* entre alérgicos e não alérgicos , controlados e não

<i>GSTT1</i>	Controlada (N=42)	Não controlada (N=18)	P-Value	Alérgica (N=53)	Não Alérgica (N=7)	P-Value
Nulo	23(54.8%)	8 (44.4%)	0.464	30(56.6%)	1(14.3%)	0.035
Não Nulo	19 (45.2%)	10 (55.6%)		23(43.4%)	6(85.7%)	

P-Value, Qui-quadrado

No grupo em que a asma esta controlada o genótipo nulo apresenta uma maior frequência (54.8%) do que o genótipo não nulo (45.2%) embora sem significado estatístico.

O genótipo nulo predomina significativamente no grupo dos asmáticos alérgicos estando presente em 56.6% do grupo, estando o genótipo não nulo presente nos restantes 43.4% da população do grupo. No caso da asma não alérgica o genótipo não nulo é o mais frequente (85.7%) do que o genótipo nulo (14.3%).

Em relação ao polimorfismo do GSTT1 o risco de se ser alérgico quando se é portador do genótipo nulo aumenta quando ajustado para o género e idade (OR 12.449; p=0.035; IC [1.188-130.43])

Quando tentamos fazer uma relação entre os dois polimorfismos do *GST* verificamos não haver uma diferença significativa entre o GSTT1 nulo e o GSTM1 nulo e funcional (P= 0.725) nem entre o GSTT1 funcional e o GSTM1 nulo e o funcional (P=0.941)- Tabela 9

Tabela 9: Relação epistática entre os dois polimorfismos dos genes GST

	Controlos	Asma	P-value
<i>GSTT1</i> nulo-GSTM1 nulo	20 (69.0)	19 (61.3)	0.725
<i>GSTT1</i> nulo-GSTM1 não nulo	9 (31.0)	12 (38.7)	
<i>GSTT1</i> não nulo-GSTM1 nulo	28 (45.2)	15 (48.4)	0.941
<i>GSTT1</i> não nulo-GSTM1 não nulo	34 (54.8)	16 (51.6)	

P-Value, Qui-quadrado

Quando tentamos fazer uma relação entre os polimorfismos do *GST* verificamos não haver uma diferença significativa entre o GSTT1 nulo e o GSTT1 funcional e ADRB2 (AAvsAG+GG) (P=0.338). Não foi possível fazer a análise entre os dois polimorfismos dos genes GSTT1 e ADRB2 (GGvsAG+AA)- (Tabela 10)

Tabela 10: Relação entre os dois polimorfismos dos genes GSTT1 e ADRB2 (AA vs AG+GG)

	GSTT1 nulo	GSTT1 não nulo	P-value
<i>ADRB₂</i> - AA	3 (7.1)	4 (9.5)	0.338
<i>ADRB₂</i> – AG + GG	20 (47.6)	15 (35.7)	

P-Value, Qui-quadrado

Quando tentamos fazer uma relação entre os polimorfismos do *GST* e *ADRB2* verificamos não haver uma diferença significativa entre o GSTM1 nulo e o GSTM1 funcional e ADRB2 (AAvsAG+GG) (P=0.293). Não foi possível fazer a análise entre os dois polimorfismos dos genes GSTM1 e ADRB2 (GGvsAG+AA) .(Tabela 11)

Tabela 11: Relação entre os dois polimorfismos dos genes GSTM1 e ADRB2 (AA vs AG+GG)

	GSTM1 nulo	GSTM1 não nulo	P-value
<i>ADRB₂</i> - AA	2 (4.18)	5 (11.9)	0.293
<i>ADRB₂</i> – AG + GG	17(40.5)	18 (42.9)	

P-Value, Qui-quadrado

Discussão

A asma é uma doença que afeta as vias aéreas provocando limitação do fluxo do ar, hipersecreção de muco e inflamação das vias aéreas (Clark, 2010). É um problema de saúde pública, que embora atingindo todas as faixas etárias, tem uma predominância em crianças e idosos e que tem tido uma tendência de crescimento do numero de pessoas afetadas (Almeida,2010). Existem vários sintomas (tosse, falta de ar, sibilos) e tipos (infantil, noturna, alérgica, gestacional) de asma. (Clark, 2010).

Em relação à variável idade a população com idade superior a 30 anos predomina em ambos os grupos mas tem uma maior predominância no grupo controlo onde representa 81.3% da população estudada (contra 60.2% na população de asmáticos) seguida pela faixa etária [15-30anos] onde os asmáticos predominam sendo 27.8% (na população controlo esta faixa etária atinge os 18.8%) e por ultimo a faixa [< 15 anos] que compõe 12% da população de asmáticos (contra 0% no grupo controlo).

Outra das limitações deste estudo é o facto da amostra para o grupo beta2 tanto no grupo de doentes como controlos não estarem em HWE ($p < 0.05$).

Ou seja neste estudo não contemplamos os indivíduos em idade pediátrica e consequentemente a asma infantil que pode ter uma origem e mecanismo diferente da dos adultos e que pode continuar a manifestar-se na idade adulta. O grupo etário com maior frequência em ambos os grupos é a faixa etária com mais de 30 anos o que significa que a maior parte dos indivíduos estudados já estão na idade adulta.

Nesta tese também se verificou que a maior parte dos asmáticos tem uma asma atópica (“alérgica”) e que tem a sua asma controlada.

Uma das características da asma é a inflamação (na qual a formação da espécies reativas de oxigénio tem um papel importante) a classe de enzimas do GST tem a função de catalisar a conjugação de substratos eletrolíticos com o GSH. (Brasch-Andersen et al., 2004; Liang et al. 2013; Kabesc et al., 2004; Gilliland et al., 2002). O GSH regenera oxidantes e sequestra espécies reativas de oxigénio e a sua diminuição pode causar um aumento do stress oxidativo (Marinho et al, 2007). Por isso é sugerido que os polimorfismos do *GST* (*M1* e *T1*) estejam relacionados com o aparecimento da doença e relacionados com o tráfego intracelular do recetor beta2. (Parente et al , 2009)

Outra das características da asma é a limitação do fluxo de ar. O recetor β_2 adrenérgico é um recetor transmembranar que esta relacionado com o relaxamento dos músculos

lisos, levando nos pulmões, a broncodilatação (Evans, W.; Mcleod, H., 2003; Gupta et al, 2015). Os agonistas do recetor promovem a ativação da proteína cinase A que vai provocar o relaxamento dos músculos. (Gupta et al, 2015; Karam et al, 2013). A medicação usada para aliviar a limitação do fluxo de ar são normalmente β agonistas que vão promover uma resposta broncodilatadora (Wu et al, 2015). Por isso é sugerido que os polimorfismos do recetor β_2 adrenérgicos estejam relacionados com o aparecimento da doença e com a capacidade de resposta a medicação.

Foram estudados 3 polimorfismos: *ADR β 2* (rs1042713), *GSTT1* e *GSTM1* em asmáticos e controlos.

Estudos anteriores tem relacionado o polimorfismo *ADR β 2* (rs1042713) com o desenvolvimento da asma (Green et al , 1995 ;Taylor et al, 2000; Hancox et al , 1998; Leite et al, 2015; Karam et al, 2013;Turki et al , 1994; Tan et al , 1997; Liu et al , 2005). Em relação ao polimorfismo do GST os dados são mais controversos e dependentes das características das populações. Existem estudos que estabeleceram uma ligação entre os polimorfismos do GST e a asma (Liang et al, 2013; Hanene et al, 2007; Hoskins et al, 2013;Kabesh et al 2004; Gilliland et al, 2002; Amaral et al 2014) enquanto outros não conseguiram estabelecer nenhuma relação (Rifai et al, 2014; Holla et al, 2006).

Liang et al (2013) conseguiu relacionar tanto o polimorfismo *GSTM1* como o do *GSTT1* com o desenvolvimento da asma embora o polimorfismo *GSTT1* apenas se tenha observado essa associação em adultos. No estudo de Hanene et al (2007) concluíram que o alelo nulo do polimorfismo *GSTM1* era mais frequente em crianças asmáticas e que o polimorfismo *GSTT1* estava associado com a asma atópica. Segundo Hoskins et al (2013) o polimorfismo *GSTM1* nulo pode ter um papel inibidor da inflamação e consequentemente protetor da asma. Kabesh et al (2004) observou que as crianças com o alelo nulo do polimorfismo do *GSTM1* eram mais suscetíveis a asma.

O recetor β_2 adrenérgico pertence a uma família de recetor transmembranares e está envolvido no relaxamento dos músculos lisos, levando nos pulmões a broncodilatação destes. Na asma a medicação inclui β agonistas e ação destes pode ser influenciada pelos polimorfismos do recetor β_2 adrenérgico.

Neste estudo o polimorfismo do *ADRB₂* não apresenta diferenças significativas entre asmáticos e controlos. O que está de acordo com os estudos de Wechsler et al (2009) e Bleecker (2010). O estudo de Wu et al (2005) também não conseguiu encontrar uma diferença significativa dentro de dois grupos (controlos e doentes). Não houve um genótipo portanto que tivesse uma frequência significativamente maior (nenhum deles está portanto mais relacionado com a frequência de infeções das vias aéreas. Mas este estudo foi realizado em crianças americanas de ascendência caucasiana e africana) e nesta tese não tivemos em nenhum grupo indivíduos em idade pediátrica.

No entanto existem outros estudos que conseguiram encontrar diferenças significativas entre os genótipos do polimorfismo do *ADRB₂* e a asma como é o caso do estudo de Green et al (1995) em que as células homozigóticas GG apresentavam uma baixa regulação na presença de agonistas e Taylor et al (2000) que sugeriu que o polimorfismo AA (com duas argininas na posição 16) está relacionado com os efeitos adversos do tratamento com agonistas do recetor β_2 . Hancox et al (1998) também observaram diferenças significativas em que os indivíduos GG não respondiam tão bem ao tratamento como os outros genótipos. Os estudos de Leite et al (2015) conseguiram observar que o alelo A era mais frequente em crianças asmáticas. Também os estudos de Karam et al (2013) verificaram que existem uma relação entre a asma e o polimorfismo Arg-16-Gly do *ADRB₂* mas neste caso eram os indivíduos com genótipo GG que apresentavam uma maior tendência para a asma noturnas do que os outros genótipos.

Também verificamos nesta tese que o alelo A do Arg-16-Gly do *ADRB₂* é mais frequente na população de asmáticos (embora sem significado estatístico) do que o alelo G o que vem de encontro com o estudo de Leite et al (2015). No entanto Turki et al (1994) ao estudar indivíduos com asma noturna observou que havia uma maior frequência do alelo G nestes. Tan et al (1997) também conseguiu observar diferenças em que os indivíduos GG eram mais suscetíveis a uma dessensibilização dos broncodilatadores.

No nosso estudo também não conseguimos observar diferenças significativas para este polimorfismo no gene entre os asmáticos controlados e não controlados nem para os asmáticos alérgicos e não alérgicos

Encontramos na literatura estudos sobre o tratamento com agonistas do *ADRB₂* e os polimorfismos em que apresentavam estudos contraditórios. Uns estudos a apontar o

alelo AA (Taylor et al, 2000) como responsável de influenciar a resposta ao tratamento e noutros anteriores referiam que era o genótipo GG (Green et al, 1995) que influenciava a resposta ao tratamento (Taylor et al, 2000)

Também encontramos na literatura estudos sobre a dessensibilização aos broncodilatadores com agonistas do β_2 como em Tan et al (1999) que observou que os indivíduos GG tinham uma capacidade maior de deixar de reagir aos tratamentos, Martinez et al (1997) e Lima et al (1999) observaram que eram os indivíduos AA que respondiam melhor aos tratamentos.

Neste estudo não foi conclusivo para os polimorfismos estudados Arg16Gly no ADRB2 devido muito provavelmente a limitações no tamanho da amostra e pelo facto de ambos os grupos não estarem em HWE.

O GST é uma enzima xenobiotica de fase II que tem a função de catalisar substratos eletrolíticos através do GSH que é um agente antioxidante quem alem de sequestrar as espécies reativas de oxigénio (que tem um papel importante na inflamação), regenera oxidantes. Nesta tese o objetivo era de verificar se existia uma diferença significativa da frequência dos polimorfismos do GSTM1 e do GSTT1 entre asmáticos e não asmáticos, e dentro dos asmáticos entre controlados e não controlados e entre asmáticos alérgicos e não alérgicos.

Neste estudo não conseguimos observar diferenças significativas entre controlos e asmáticos para o polimorfismo do gene GSTM1 tal como no estudo de Rifai et al (2014) e Holla et al (2006) e contrariamente aos resultados apresentados por Liang et al (2013), Hanene et al (2007), Hoskins et al (2013), Kabesh et al (2004) e Gilliland et al (2002) que conseguiram encontrar diferenças significativas neste polimorfismo no gene quando comparou asmáticos e controlos.

Também concluimos neste estudo que o genótipo nulo era mais frequente nos controlos e nos asmáticos embora não significativo. No estudo de Rifai et al (2014) e de Hanene et al (2007) o alelo nulo do GSTM1 também era mais frequente entre os asmáticos do que o alelo funcional embora no estudo de Rifai et al (2014) essas diferenças não tenham sido significativas.

O genótipo nulo também é mais frequente neste estudo nos indivíduos com asma controlada e nos indivíduos com asma alérgica embora sem significado estatístico.

Neste estudo também não se encontraram diferenças significativas para os polimorfismos do *GSTM1* entre asmáticos controlados e não controlados nem entre os asmáticos alérgicos e não alérgicos. O estudo de Rifai et al (2014) também não encontrou diferenças para este gene entre asmáticos alérgicos e não alérgicos.

Na literatura encontramos estudos que revelaram existir diferenças significativas entre os polimorfismos deste gene e os grupos étnicos, sugerindo que a etnia pode influenciar a frequência destes genótipos e consequentemente a sua influência ou não na asma (Rifai et al, 2014;Liang et al, 2013;Gilliand et al,2002)

Para o gene *GSTT1* conseguimos observar diferenças significativas entre o polimorfismo nulo e funcional ($p=0.024$) entre asmáticos e controlos estando de acordo com os estudos de Liang et al (2013), Hoskins et al (2013) e Kabesh et al (2004) contrariamente aos estudos de Rifai et al (2014).

Não conseguimos observar para este polimorfismo no gene (*GSTT1*) uma diferença significativa entre asmáticos controlados e não controlados, mas no entanto verificamos diferenças significativas entre asmáticos alérgicos e não alérgicos ($p=0.035$). Nos estudos de Rifai et al (2014 não conseguiram observar diferenças significativas entre asmáticos alérgicos e não alérgicos.

Avaliando no seu conjunto *GSTM1* e o *GSTT1* verificámos que não existe uma associação significativa entre asmáticos e controlos quando comparámos o alelo nulo do *GSTT1* com *GSTM1* tanto nulo como funcional nem quando comparámos o alelo funcional do *GSTT1* com o *GSTM1* tanto nulo como funcional.

Por este estudo de associação entre 2 polimorfismos para os genes da *GSTM1* e *GSTT1*, podemos concluir que são os polimorfismos em cada gene individualmente que podem afetar a doença asmática. O que está de acordo com o estudo de Holla et al (2006).

Analisando a dentro do grupo dos asmáticos a relação entre o *GSTT1* (nulo e funcional) e os *ADRB₂* (AA e AG+GG e o *GSTM1* e os *ADRB₂* (AA e AG+GG) também não se verificam diferenças significativas ($p= 0.338$ e $p=0.293$ respectivamente)

Conclusão

Dos polimorfismos analisados, verificou-se que o polimorfismo da *GSTT1* poderá ter um papel importante na patofisiologia da asma, nomeadamente, no controlo do stress oxidativo e inflamação. O *GSTT1* apresenta diferenças entre asmáticos e controlos (sendo o não nulo mais frequente nos controlos) e o nulo mais frequente nos asmáticos alérgicos; mas devido à pequena dimensão da amostra outros trabalhos futuros deverão confirmar estes dados. A família das enzimas do GST está relacionada com capacidade de regeneração de oxidantes e com o sequestro de espécies reativas do oxigénio. Com estes resultados em que apenas o *GSTT1* revelou diferenças significativas podemos deduzir que os polimorfismos deste gene realmente tem influência sobre o desenvolvimento da doença e sobretudo quando esta tem uma base alérgica.

Também observamos diferenças significativas no *GSTT1* entre doentes alérgicos e não alérgicos sendo o alelo nulo mais frequente nos asmáticos alérgicos e o alelo não nulo o mais frequente nos asmáticos não alérgicos.

Para o polimorfismo do gene *GSTM1* não conseguimos encontrar diferenças significativas nem entre controlos e asmáticos, nem entre doentes controlados e não controlados e nem entre doentes alérgicos e não alérgicos.

O estudo de associação entre 2 polimorfismos para os genes da *GSTM1* e *GSTT1*, concluímos que são os polimorfismos em cada gene individualmente que podem afetar a doença asmática. Também não encontramos diferenças quando analisamos a associação entre o *GSTT1* e o *ADRβ₂* e o *GSTM1* e o *ADRβ₂*.

Para os polimorfismos do gene do recetor β_2 adrenérgico não observamos diferenças significativas entre controlos e asmáticos nem entre os asmáticos (quer controlados e não controlados, quer entre alérgicos e não alérgicos), mas pensamos que se devem a limitações da amostra nomeadamente por não estar em equilíbrio de HWE (tanto para controlos como doentes).

Bibliografia

<http://www.cdc.gov/asthma/faqs.html> (acedido em 2-10-15)

Almeida, A. 2010; Relatório síntese das atividades do ano 2010 da comissão de coordenação do programa nacional de controlo da asma

Clark, M.; 2011; *Asthma: A clinicians`s Guide*.

Lemanske Jr, R. ; Busse, W.; 2010; Asthma: clinical expression and molecular mechanisms; Journal of Allergy and Clinical Immunology 2010, 125:s95-102

Brasch-Andersen , C ; Christiansen , L.; Tan , Q. ; Haagerup , A. ; Vestbo , J. ; 2004 ; Possible gene dosage effect of Glutathione-S-transferases on atopic asthma : using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers ; Human Mutation , 2004 , 24 , pp 208-214

Evans, W., Mcleod, H., 2003, Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects, New England Journal of Medicine, 348-6. pp538-549

Martinez, F.; 2007; Genes, Environments, development and asthma: a reappraisal; European Respiratory Journal 2007, 29: 179–184

<http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/asthma/treatment> (acedido em 1-10-15)

Liang , S. ; Wei, X. ;Gong , C. ; Wei , J. ; Chen , Z. ; Chen ,X . ; Wang, Z.; Deng J.; 2013; Significant association between asthma risk and the GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms. An update meta-analysis of case-control studies; Respiriology, 2013, 18, pp774-783

Kabesch , M.; Hoefler, C. ; Carr , D. ; Leupold, W. ;Weiland , S; Von Mutius , E. ;2004; Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma ; Thorax , 2004 , 59: 569-573

Gilliland , F. ; Gauderman , W. ; Vora ,H. ; Rappaport, E. ;Dubeau ,L. ; 2002 ; Effects of Glutathione-S-Transferase M1 , T1 and P1 on childhood lung function growth ; American Journal of Respiratory Critical Care Medicine , 2002, vol 166 pp 710-716

Hoskins, A.; Reiss, S.; 2013; Asthmatic airway neutrophilia after allergen challenge is associated with the glutathione S-transferase M1 genotype. ; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2013, 187, pp 34-41

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTT1> (acedido em 15-10-15)

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GSTM1> (acedido em 15-10-15)

Marinho , C.; Alho , I.; Arduino , D.; Falcão , L.; Brás Nogueira ,J.; Bicho ,M.; 2007; GSTM1/T1 and MTHFR polymorphisms as risk factors for hypertension ;Biochemical and biophysical research communications ,2007; 353 , 344-350

<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?n=3126> (acedido em 16-04-16)

Rifai , N. ; Moustafa , N. ; Degheidy, N. ; Wilson , M. ; 2014 ; Glutathione S transferase Theta 1 and Mu 1 gene polymorphisms and phenotypic expression of asthma in Egyptian children : a case-control study ; Italian Journal of Pediatrics , 2014 , 40:22

Karam , R.; Pasha , H.; El-Shal , A.; Rahman , H.; Gad ,D.; 2012 ; Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children ; Gene , 2012 , 497 , pp 314-319

Hanene, C.; Jihene, L.; Jamel, A.; Kamel. H.; Agnes, H.; 2007; Association of GST genes polymorphisms with asthma in Tunisian children; Mediators of Inflammation, 2007, doi:10.1155/2007/19564

Holla , L. ;Stejskalova, A. ;Vasku , A. ; 2006 ; Polymorphisms of the GSTM1 and GSTT1 genes in patients with allergic diseases in the Czech population ; Allergy , 2006 , 61:265-267

Amaral F. ;Ramasamy , A. ; Castro-Giner ,F. ;Minelli , C. ; Accordini , S. ; Sorheim , I. ; Pin , I. ; Kogevinas , M. ; Jørgi , R. ; Balding , D. ; Norback , D. ; Verlato , G. ;Olivieri , M. ; Probst-Hensch , N. ; Janson, C. ; Zock , J. ; Heinrich , J. ; Jarvis, D. ; 2014 ; Interaction between gas cooking and GSTM1 Null genotype in bronchial responsiveness : results from European community respiratory health survey ; Thorax , 2014 , 69: 558-564

Wu , P.; Larkin , E.; Reiss , S.; Carrol , K; Summar , M.; Minton,P.; Woodward , K.; Liu , Z.; Islam, J.; Hartert, T.; Moore, P.; 2015 ; β_2 -adrenergic receptor promoter

haplotype influences the severity of acute viral respiratory tract infection during infancy : a prospective cohort study , BMC Medical Genetics , 2015, 16:82

Karam , R.; Sabbah , N.; Zidan , H.; Rahman , H.; 2013 ; Association between genetic polymorphism of B2 adrenergic receptors and nocturnal asthma in Egyptian children ; Journal of Investigacional Allergology and Clinical Immunology , 2013 , 23(4) , pp 262-266

Turki ,J.; Pak,J.; Green , S.; Martin , R.; Liggett ,S.; 1994 ; Genetic Polymorphisms of the β -adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma ; Journal of Clinical Investigation , 1994 , 95 , pp1635-1641

Gupta , M.; Asosingh ,K.; Aronica , M.; Comhair , S.; Cao , G.; Erzurum , S.; Panettieri , R.; Prasad , S.; 2015 ; Defective resensitization in Human airway smooth muscle cells evokes β -adrenergic receptor dysfunction un severe asthma ; PLOS ONE , “015 , DOI : 10.1371/journal.pone.0125803

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRB2> (acedido em 15-1-16)

Green , S.; Turki, J.; Beljarano , P.; Hall,I.; Liggett, S.; 1995; Influence of beta 2- adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells ; American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology , 1995, 13, pp25-33

Taylor R. , Drazen , J. , 2000 , Asthma exacerbations during long term β agonist use : influence of β_2 adrenoceptor polymorphism , Thorax , 55 , pp 762-767

Hancox , R.; Sears, M.; Taylor ,D.; 1998 ; Polymorphism of the β_2 -adrenoceptor and the response to long-term β_2 -agonist therapy in asthma; European Respiratory Journal , 1998 , 11, pp 589-593

Wechsler , M.; Kunselman ,S.; Chinchilli ,V. ; Bleecker, E.; Boushey ,H.; Calhoun ,W.; Ameredes, B.; Castro, M.; Craig , T.; Denlinger ,L.; Fahy ,J.; Jarjour, N.; Kazani ,S.; Kim , S.; Kraft ,M.; Lazarus, S.; Lemanske, R.; Markezich ,A.; Martin ,R.; Permaul ,P.; Peters ,S.; Ramsdell ,J.; Sorkness ,C.; Sutherland, E.; Szeffler ,S.; Walter, M.; Wasserman ,S.;Israel, E.; 2009; Effect of beta2-adrenergic receptor polymorphism on response to longacting beta2 agonist in asthma (LARGE trial): a genotype-stratified, randomised, placebo-controlled, crossover trial; Lancet, 2009, 374, pp1754-1764

Bleecker, E.; Nelson, H.; Kraft, M.; Corren, J.; Meyers, D.; Yancey, S.; Anderson, W.; Emmett, A.; Ortega, H.; 2010; β_2 -Receptor Polymorphisms in Patients Receiving Salmeterol with or without Fluticasone Propionate ; American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine , 2010 , 181 , pp 675-687

Leite, N. Lazarotto, L.; Milano, G.; Titski, A. Consentino, C. Mattos, F. Andrade, F. Furtado-Alle, L.; 2015; Associação do gene ADRB” com sobrepeso e asma em crianças e adolescentes e a sua relação com a aptidão física; Revista Paulista de Pediatria, 2015, 33, pp 381-386

Tan, S.; Hall, I.; Dewar, J.; Dow, E.; Lipworth, B.; 1997; Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics ; Lancet , 1997 , 350 ; pp995-999

Martinez, F.; Graves, P.; Baldini, M.; Solomon, S.; Erickson, E.; 1997 ; Association between genetic polymorphisms of β_2 -adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing ; Journal of Clinical Investigation , 1997 , 100 , 12 , pp3184-3188

Lima, J.; Thomason, D.; Mohamed, M.; Eberle, L.; Self, T.; Johnson, J.; 1999; Impact of genetic polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics .; Clinical Pharmacology Therapy, 1999 , 65 , pp519-525

Parent, A.; Hamelin, E.; Germain, P.; Parent, J.; 2009; Rab11 regulates the recycling of β_2 -adrenergic receptor through a direct interaction; Biochemical Journal, 2009, 418 pp 163-172

Anexos

Extração do ADN genómico:

Extração de ADN

Preparação dos reagentes e armazenamento

TKM 1: o reagente TKM1 foi obtido através da adição de 10 ml de Tris-HCl (pH 7,6) com 10 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ e 2mM de EDTA

TKM X-100: o reagente TKM X-100 foi obtido através de uma solução de 2,5% (V/V) de triton X-100 em tampão TKM1

TKM 2: o reagente TKM 2 foi obtido através da adição de 10 mM de Tris-HCl (pH 7,6) com 10 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 0,4 M de NaCl e 2mM de EDTA

IGEPAL CA 830: Octilfenoxi (polietilenoxi) etanol (reagente já preparado comercialmente)

SDS: 10%: Dodecil sulfato de sódio (reagente já preparado comercialmente)

NaCl saturado (6M): o reagente foi obtido através da adição de NaCl a H₂O ate que a solução fique saturada

Etanol absoluto: (reagente já preparado comercialmente)

Tampão TE : o reagente foi obtido através da adição de 10mM de Tris-HCl (pH 8) a 1mM de EDTA

Todos os reagentes ficaram armazenado a temperatura ambiente

Protocolo de extração:

Sangue periférico foi recolhido dos doentes e dadores e armazenado num tubo com anticoagulante EDTA

Na altura da extração o sangue foi transferido para um tubo rolhado e graduado de 10 ml.

Foi adicionado um volume de TKM X-100, do qual uma parte é adicionada ao tubo de colheita, para não haver desperdícios, e depois junta ao sangue no tubo graduado.

Adicionou-se 25 ul IPGEPAL CA 630 por cada ml de sangue recolhido com a função de lisar as células para que ocorra a libertação dos constituintes celulares (incluindo ADN).

Agitou-se o tubo através de uma inversão energética.

Seguidamente realizou-se uma centrifugação a 2200 rpm durante 15 minutos à temperatura de 4°C que deve ser repetida se o pellet resultante não estiver aderente ao fundo do tubo.

O sobrenadante foi rejeitado e ao pellet foi adicionado 1ml de tampão TKM 1 por cada ml de sangue recolhido.

Em seguida realizou-se uma centrifugação a 4°C durante 10 minutos e a uma velocidade de 1600 rpm e voltou-se a repetir o passo anterior de rejeição do sobrenadante e adição de TKM 1.

Repetiu-se o passo anterior mais duas vezes até se obter um pellet branco.

O pellet foi ressuspensionado em 160µl de TKM 2 por cada ml de sangue recolhido, com a ajuda de um vortex.

Adicionou-se 10ml de SDS a 10% por cada ml de sangue recolhido e foi novamente ressuspensionado com a ajuda de uma micropipeta.

A mistura foi incubada durante dez minutos a 55°C

Transferiu-se a mistura para um eppendorf e adicionou-se 60µl de NaCl saturada por cada ml de sangue recolhido.

Agitou-se o tubo eppendorf no vortex.

Centrifugou-se a mistura durante trinta minutos a temperatura ambiente a uma velocidade de 12000 rpm (processo Salting Out)

Verteu-se o sobrenadante (ADN) que resultou da centrifugação para um tubo de vidro e adicionam-se dois volumes de etanol absoluto gelado.

Selou-se o tubo com parafilme e inverteu-se o tubo até ocorrer a precipitação do ADN –

Ressuspendeu-se o ADN em 200µl de tampão TE colocado num tubo eppendorf e armazenou-se a 4°C

Errata

Pag 2 onde se lê fisopatologia deve ler-se fisiopatologia

Pag 6 onde se lê adrenergicos deve ler-se adrenérgicos

Pag 7 onde se lê nanometros deve ler-se nanómetros

Pag 11 onde se lê esteroides deve ler-se esteroides

Pag 12 onde se lê alteraçoes deve ler-se alterações

Pag 12 onde se lê vao deve ler-se vão

Pag 18 onde se lê corticosteróides deve ler-se corticosteroides

Pag 23 onde se lê invidiuos deve ler-se indivíduos

Pag 36 onde se lê genotipo deve ler-se genótipo

Pag 47 onde se lê tambem deve ler-se também

Pag 47 onde se lê respectivamente deve ler-se respetivamente

Pag 48 onde se lê patofisologia deve ler-se fisiopatologia